

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年1 月24 日 (24.01.2002)

PCT

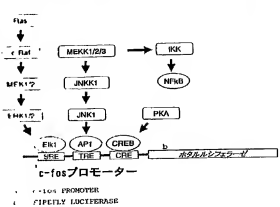
(10) 国際公開番号
WO 02/06520 A1

- (51) 国際特許分類: C12Q 1/48, G01N 33/50, 33/15, C12N 15/00, A61K 45/00, 39/395, A61P 1/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/06171
- (22) 国際出願日: 2001 年7 月17 日 (17.07.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2000-223892 2000 年7 月19 日 (19.07.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
中外分子医学研究所 (CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.) [JP/JP];
〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 Ibaraki (JP)
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 根津淳一 (NEZU, Jun-ichi) [JP/JP]; 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 中外製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 水野敬和 (MIZUNO, Takakazu) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 大瀬飛鳥 (OSE, Asuka) [JP/JP]; 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社 中外分子医学研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 清水初志. 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): AF, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,

[続表有]

(54) Title: METHOD OF SCREENING COMPOUND CONTROLLING MEK/ERK SIGNAL TRANSDUCTION AND MEDICINAL USE OF THE COMPOUND

(54) 発明の名称: MEK/ERKシグナル伝達を調節する化合物のスクリーニング方法および該化合物の薬剤用途



(57) Abstract: It is found out that LKB1 specifically inhibits the Ras/MEK/ERK signal transduction pathway. It is suggested that this inhibition is caused by the action of LKB1 on the downstream of MEK1 in the above signal transduction pathway and, therefore, depends on the kinase activity of LKB1. Based on these facts, it is possible to develop drugs control the MEK/ERK signal by using LKB1 as a target. These drugs are usable in treating various diseases including PJS in which the MEK/ERK signal participates.

(57) 要約:

LKB1がRas/MEK/ERKシグナル伝達経路を特異的に抑制することを見出した。この抑制はLKB1が該シグナル伝達経路のMEK1より下流に作用することにより引き起こされ、LKB1のキナーゼ活性に依存していることが示唆された。これら事実から、LKB1を標的としてMEK/ERKシグナルを制御する薬剤を開発することが可能であり、このような薬剤はMEK/ERKシグナルが関与するPJSを含む様々な疾患の治療薬になりうる。



PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

MEK/ERKシグナル伝達を調節する化合物のスクリーニング方法および該化合物の薬剤用途

技術分野

本発明は、ポイツ・イエーガーズ症候群に関連する細胞内シグナル伝達を調節する化合物のスクリーニングおよびその薬剤用途に関する。

背景技術

ポイツ・イエーガーズ症候群 (Peutz-Jeghers Syndrome, MIM 175200, PJS) は、消化管におけるポリポシス症と、粘膜や皮膚における色素班形成を主な症候とするヒトの遺伝病である。PJSは常染色体優性遺伝形式により遺伝するが、1997年 Hemminki 等により、PJS患者家系における連鎖 (リンケージ) 解析からその原因遺伝子は、第19番染色体p13.3領域にマップされることが示された (Hemminki A et al., Nat Genet 1997 Jan;15(1):87-90)。この領域には、本発明者らが新規プロテインキナーゼ探索プロジェクトにおいて見いだしていた新規セリン/スレオニンキナーゼ LKB1 (GenBank アクセッションナンバー U63333) が存在する。Jenne 等はこれを原因遺伝子の候補であると考え、PJS患者における LKB1 遺伝子の変異解析を行ったところ、調べた全ての患者において LKB1 遺伝子の変異が存在することが明らかとなった (Jenne DE et al., Nat Genet 1998 Jan;18(1):38-43)。さらに、他のグループからも同様の報告が相次いでなされ、現在までに少なくとも60種類以上の LKB1 遺伝子変異が PJS 患者において見いだされている (Hemminki A et al., Nature 1998 Jan 8;391(6663):184-7、Nakagawa H et al., Hum Genet 1998 Aug;103(2):168-72、Resta N et al., Cancer Res 1998 Nov 1;58(21):4799-801、Ylikorka la A et al., Hum Mol Genet 1999 Jan;8(1):45-51)。また、本発明者等は、LKB

1 遺伝子産物が自己リン酸化能を持つキナーゼであり、PJS患者において見いだされたミスセンス変異はキナーゼ活性を失う変異であることの証明を行った (Mehenni H et al., Am J Hum Genet 1998 Dec;63(6):1641-50)。これらの事実から、LKB1 セリン/スレオニンキナーゼの遺伝子変異による機能欠損がPJSの発症原因であることが確認されるに至っている。

また、PJS患者は様々な癌に対する発症リスクが健常人に比較して著しく増加していることが疫学的研究から知られており、このことからその原因遺伝子は癌抑制遺伝子様の活性を持つことが推測されていた。実際、PJSと無関係な散発性の癌においてもLKB1遺伝子の変異がみられることが報告されてきており、一般の散発性癌においてもLKB1遺伝子の不活が関与していることが明らかとなりつつある (Dong SM et al., Cancer Res 1998 Sep 1;58(17):3787-90, Rowan A et al., J Invest Dermatol 1999 Apr;112(4):509-11, Guldberg P et al., Oncogene 1999 Mar 4;18(9):1777-80, Su GH et al., Am J Pathol. 1999 Jun;154(6):1835-40, Wang ZJ et al., J Pathol. 1999 May;188(1):9-13)。

ところで、単一のLKB1遺伝子の異常により、ポリポーシス症や、癌化といったPJS患者にみられる表現形質が現れるという事実からは、LKB1が細胞増殖や細胞分化の制御機構において要となる非常に重要な役割を果たしていることが示唆される。従って、LKB1が関与する細胞内生理機能を分子レベルで明らかにすることができれば、その分子機構を標的とする薬剤を合理的に設計することができ、これによりこれらの表現形質を人為的にコントロールすることが可能であると考えられる。そして、このような薬剤には、PJSを初めとする疾患の治療や予防への応用も期待できる。

しかしながら、現段階では、LKB1が関与する細胞内生理機構に関しては、その分子レベルでの解明は、ほとんどなされていない。

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、PJSの原

因遺伝子であるLKB1が関与する細胞内生理機構を解明すると共に、該細胞内機構を制御する化合物およびそのスクリーニング方法を提供することにある。さらに、本発明は、該細胞内生理機構を制御する化合物を有効成分とする薬剤を提供することをも目的とする。

本発明者等は、LKB1が関与する細胞内シグナル伝達経路の特定を目指し、LKB1の様々な既知のシグナル伝達経路への関与について検討を行った。その結果、HeLa細胞において、LKB1が活性化型K-Rasによるc-fos遺伝子プロモーターの活性化を強く抑制することが明らかとなった(図1)。このc-fosプロモーターは、既知の転写調節因子結合エレメントとして、SRE(血清反応性エレメント)、CRE(cAMP反応性エレメント)、及びTRE(TPA反応性エレメント)を持つが、Rasによるこのプロモーターの活性化は、Ras/MEK/ERKを介する経路により、主にSREが活性化されることにより起こることが知られている(Fukumoto Y et al., J Biol Chem 1990 Jan 15;265(2):774-80)。即ち、図2に示したように、この経路は、Rasによりc-Rafキナーゼが活性化され、それによりMEK1, 2キナーゼ、ついでERK1, 2キナーゼが活性化され、最終的に転写因子であるElk1がリン酸化されることにより遺伝子転写が活性化される経路であり、いわゆるRas/MEK/ERKカスケードとして、主に細胞の増殖調節において非常に重要な役割をしていることが良く知られている。LKB1は活性化型K-Rasを強制発現することによって活性化されたこのシグナル伝達経路のいずれかのステップに作用してSREの活性化を抑制したものと考えられた。そこで、本発明者等は、次に、LKB1が関与するステップについて調べたところ、LKB1はRasの下流因子であるMEK1による人工的SREの活性化をも強く抑制することが明らかとなった(図3)。このことから、LKB1は、少なくともMEK1よりも下流で作用しているものと考えられた。

一方、MEKK1によるc-fosプロモーターの活性化(図4)、同じくMEKK1によるNF- κ B (Nuclear Factor of κ B cells) 結合エレメントの活性化(図5)、PKA (cAMP依存性キナーゼ) によるCREを介したc-fosプロモーターの活性化(図6)に対して

はLKB1は全く作用しないことが判明した。このことから、LKB1の作用は、Ras/MEK/ERKシグナル伝達経路特異的であると考えられた。

次に、PJS患者において見出された変異体（L67P、D176N、W308C）の作用について調べた（図7）。その結果、これらのキナーゼ活性が減弱した変異体は、その抑制効果もまた著しく減弱していることが明らかとなった。

Ras/MEK/ERKシグナル伝達経路は、増殖因子レセプターなどからのシグナルをRasを介して伝達する経路として、正常細胞の増殖制御機構などにおいて重要な役割を持つことが知られている。PJS患者においては、遺伝子変異によりLKB1キナーゼが不活化し、MEK/ERKシグナルの抑制が起こらなくなることにより細胞の過剰な増殖が起こり、ポリーポーシスや発癌といった形質となって現れることが予想される。

従って、LKB1キナーゼ活性を阻害する、あるいはLKB1タンパク量を減少させることにより、MEK/ERKシグナル伝達を活性化することができ、逆に、LKB1キナーゼを活性化する、あるいはLKB1タンパク量を増加させることにより、このシグナル伝達を抑制することが可能であると考えられる。LKB1遺伝子やその産物であるキナーゼを標的とする薬剤は、MEK/ERKシグナル伝達の異常により生じる様々な疾病に対して有効であることが期待される。

本発明は以上の知見に基づいて完成されたものであり、MEK/ERKシグナル伝達機構を制御する化合物およびそのスクリーニング法、並びに、該シグナル伝達機構を制御する化合物を有効成分とする薬剤を提供する。

より詳しくは、本発明は、

- (1) MEK/ERKシグナル伝達を抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) LKB1蛋白質に被検試料を接触させる工程、
 - (b) LKB1蛋白質のキナーゼ活性を測定する工程、および
 - (c) 被検試料を接触させない場合と比較して、工程（b）において測定されるキナーゼ活性を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(2) MEK/ERKシグナル伝達を抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) LKB1遺伝子を発現する細胞に被検試料を接触させる工程、
- (b) 該細胞におけるLKB1遺伝子の発現量を測定する工程、および
- (c) 被検試料を接触させない場合と比較して、工程(b)において測定されるLKB1遺伝子の発現量を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(3) MEK/ERKシグナル伝達を促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) LKB1蛋白質に被検試料を接触させる工程、
- (b) LKB1蛋白質のキナーゼ活性を測定する工程、および
- (c) 被検試料を接触させない場合と比較して、工程(b)において測定されるキナーゼ活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(4) MEK/ERKシグナル伝達を促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) LKB1遺伝子を発現する細胞に被検試料を接触させる工程、
- (b) 該細胞におけるLKB1遺伝子の発現量を測定する工程、および
- (c) 被検試料を接触させない場合と比較して、工程(b)において測定されるLKB1遺伝子の発現量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(5) ポイツ・イエーガーズ症候群の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) c-fosプロモーターまたはSREの下流にレポーター遺伝子が機能的に結合された構造を含むベクター、およびRas/MEK/ERKシグナル伝達経路を構成する蛋白質を発現するベクターが導入された細胞を提供する工程、

- (b) 該細胞に被検試料を接触させ、レポーター活性を測定する工程、および
- (c) 被検試料を接触させない場合と比較して、工程(b)において測定されるレポーター活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(6) Ras/MEK/ERKシグナル伝達経路を構成する蛋白質が、Ras、c-Raf、MEK1、およびMEK2からなる群より選択される、(5)に記載の方法、

(7) (1)または(2)に記載の方法により単離しうる、MEK/ERKシグナル伝達を抑制する化合物、

(8) (3)または(4)に記載の方法により単離しうる、MEK/ERKシグナル伝達を促進する化合物、

(9) (5)または(6)に記載の方法により単離しうる、ポイツ・イエーガーズ症候群の治療薬候補化合物、

(10) LKB1のキナーゼ活性を促進する化合物を有効成分とする、MEK/ERKシグナル伝達を抑制する薬剤、

(11) 化合物が(1)に記載の方法により単離しうる化合物である、(10)に記載の薬剤、

(12) LKB1遺伝子の発現を促進する化合物を有効成分とする、MEK/ERKシグナル伝達を抑制する薬剤、

(13) 化合物が(2)に記載の方法により単離しうる化合物である、(12)に記載の薬剤、

(14) LKB1を有効成分とする、MEK/ERKシグナル伝達を抑制する薬剤、

(15) LKB1のキナーゼ活性を抑制する化合物を有効成分とする、MEK/ERKシグナル伝達を促進する薬剤、

(16) 化合物がLKB1蛋白質に結合する抗体である、(15)に記載の薬剤、

(17) 化合物が(3)に記載の方法により単離しうる化合物である、(15)に記載の薬剤、

(18) LKB1遺伝子の発現を抑制する化合物を有効成分とする、MEK/ERKシグナル伝達を促進する薬剤、

(19) 化合物が(4)に記載の方法により単離しうる化合物である、(18)に記載の薬剤、

(20) MEK/ERKシグナル伝達を抑制する化合物を有効成分とする、ポイツ・イエーガーズ症候群治療薬、

(21) c-fosプロモーターまたはSREの活性を抑制する化合物を有効成分とする、ポイツ・イエーガーズ症候群治療薬、および

(22) 化合物が(5)または(6)に記載の方法により単離しうる化合物である、(20)または(21)に記載の治療薬、を提供するものである。

なお、本発明において「MEK/ERKシグナル伝達」とは、低分子量GTP結合タンパク質の一つであるRasにより、c-Rafキナーゼが活性化され、次いでMEK1、2キナーゼが活性化され、次にERK1、2キナーゼが活性化され、最終的にElk1などの転写因子がリン酸化されて活性化し、標的遺伝子の発現が誘導される経路(Ras/MEK/ERKシグナル伝達経路)における、MEKより下流のシグナル伝達を意味する。

本発明は、MEK/ERKシグナル伝達を調節(促進あるいは抑制)する化合物をスクリーニングする方法を提供する。本実施例において、LKB1蛋白質がMEK/ERKシグナル伝達を抑制することが示された。そして、この抑制が、LKB1蛋白質のキナーゼ活性に基づくことが示唆された。これらの事実、LKB1蛋白質のキナーゼ活性あるいはLKB1蛋白質の発現を調節することにより、MEK/ERKシグナル伝達を調節することができることを意味する。本発明のMEK/ERKシグナル伝達を調節する化合物のスクリーニング方法は、かかる知見に基づくものである。

このスクリーニング方法の一つの態様は、LKB1蛋白質のキナーゼ活性を指標とする方法に関し、LKB1蛋白質に被検試料を接触させ(工程(a))、LKB1蛋白質のキナーゼ活性を測定し(工程(b))、被検試料を接触させない場合と比較して、工程(b)において測定されるキナーゼ活性を増加または低下させる化合物を選択する(工程(c))ことによって実施することができる。

被検試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。被検試

料を接触させる本発明のタンパク質は、例えば、精製したタンパク質であっても、担体に結合させた形態であってもよい。また、LKB1タンパク質を発現する細胞に被検試料を接触させても良い。

LKB1タンパク質のキナーゼ活性は、例えば、LKB1タンパク質による自己リン酸化(オートホスフォリレーション)活性として検出することができる。該活性は、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ からの ^{32}P のLKB1タンパク質への転移量として液体シンチレーションカウンター等で測定することができる。

キナーゼ活性の検出の具体的な方法の一例を以下に挙げる。LKB1発現用プラスミドDNA(pcdNA3/LKB1myc)などの約10 μg を、SuperFect (Qiagen社)を用いた方法により、COS7細胞、HeLa細胞(子宮頸部癌由来細胞)、HeLa細胞由来細胞(HeLa S3など)、G361細胞(メラノーマ)、ヒトTHP1、K562、SW480、HEK293、マウスNIH3T3、HL60(ヒト白血病由来細胞)、正常線維芽細胞、正常上皮細胞、正常血管平滑筋細胞、正常骨芽細胞などの細胞に導入(トランスフェクション)する。すなわち、約10⁶個の細胞を10cmディッシュに蒔き、一晚培養した後、10 μg のプラスミドDNAと60 μl のSuperFectの混合物を添加し、約3時間培養を行う。その後培養液を新しいものに交換し、さらに1-2日間培養した後、細胞をトリプシン-EDTA液ではがして回収する。細胞をNP40 キナーゼライシスバッファー(10mM トリス塩酸pH7.8、1% NP40、0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA、50mM フッ化ナトリウム、5mM ピロリン酸ナトリウム、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アプロチニン、1mM PMSF)に懸濁し、4℃で30分混合することによりタンパク質を可溶化する。こうして得た細胞ライゼートにプロテインA/Gプラスアガロース(Santa Cruz社)を加え30分混合することにより非特異的にビーズに吸着するタンパクを除く。次に抗c-Myc抗体A14(Santa Cruz)を加え4℃で1時間放置した後、プロテインA/Gプラスアガロースを加えてさらに1時間放置する。これを遠心する事により免疫複合体を沈殿させ、NP40 キナーゼライシスバッファー、1Mの塩化ナトリウムを含んだバッファー、および50mM トリス塩酸(pH7.8)によって何回か洗浄し、キナーゼアッセイに供する。

キナーゼアッセイは50mM トリス塩酸(pH 7.8)、1mM DTT、10mM 二価カチオン(Mnなど)および10 μ Ciの[γ -³²P]ATPを含む全量50 μ lの反応系で行う。免疫沈降物をこのキナーゼアッセイ溶液中で37℃、30分保温して反応を行った後、SDS-PAGEサンプルバッファーを加え煮沸することにより反応を停止しSDS-PAGEを行う。ゲルをメタノール/酢酸溶液で固定した後、乾燥させ、BAS200イメージアナライザー(Fuji Film社)によってイメージを解析する。キナーゼ活性は、また、文献(Am J Hum Genet (1988) Dec;63(6):1641-50、Hum Mol Genet (1999) Jan;8(1):45-51)に記載の方法で検出することもできる。

この測定の結果、被検試料を接触させない場合と比較して、被検試料を接触させた場合において測定されるLKB1蛋白質のキナーゼ活性が増加していれば、用いた被検試料は、MEK/ERKシグナル伝達を抑制する化合物の候補となり、一方、キナーゼ活性が低下していれば、用いた被検試料は、MEK/ERKシグナル伝達を促進する化合物の候補となる。

本発明におけるMEK/ERKシグナル伝達を調節する化合物のスクリーニング方法の他の一つの態様は、LKB1遺伝子の発現を指標とする方法に関し、LKB1遺伝子を発現する細胞に被検試料を接触させ(工程(a))、該細胞におけるLKB1遺伝子の発現量を測定し(工程(b))、被検試料を接触させない場合と比較して、工程(b)において測定されるLKB1遺伝子の発現量を増加または低下させる化合物を選択する(工程(c))ことによって実施することができる。

被検試料としては、上記スクリーニングと同様に、特に制限はない。また、LKB1遺伝子を発現する細胞としては、例えば、COS7細胞、HeLa細胞(子宮頸部癌由来細胞)、HeLa細胞由来細胞(HeLa S3など)、G361細胞(メラノーマ)、ヒトTHP1、K562、SW480、HEK293、マウスNIH3T3、HL60(ヒト白血病由来細胞)、正常線維芽細胞、正常上皮細胞、正常血管平滑筋細胞、正常骨芽細胞などの細胞を好適に用いることができる。LKB1遺伝子の発現量の検出は、ノーザンブロットング法やRT-PCR法などの当業者に公知の手法を用いて行なうことができる。

この測定の結果、被検試料を接触させない場合と比較して、被検試料を接触させた場合において測定されるLKB1遺伝子の発現量が増加していれば、用いた被検試料は、MEK/ERKシグナル伝達を抑制する化合物の候補となり、一方、LKB1遺伝子の発現量が低下していれば、用いた被検試料は、MEK/ERKシグナル伝達を促進する化合物の候補となる。

また、本発明は、ポイツ・イエーガーズ症候群の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法を提供する。本実施例においてポイツ・イエーガーズ症候群の原因遺伝子であるLKB1がMEK/ERKシグナル伝達を抑制することが示された。これらの事実、MEK/ERKシグナル伝達の抑制を指標としてポイツ・イエーガーズ症候群の治療薬候補化合物をスクリーニングできることを意味する。本発明のポイツ・イエーガーズ症候群の治療薬候補化合物のスクリーニング方法は、かかる知見に基づくものである。

この方法は、c-fosプロモーターまたはSREの下流にレポーター遺伝子が機能的に結合された構造を含むベクター、およびMEK/ERKシグナル伝達を構成する蛋白質を発現するベクターが導入された細胞を提供し（工程（a））、該細胞に被検試料を接触させ、レポーター活性を測定し（工程（b））、被検試料を接触させない場合と比較して、工程（b）において測定されるレポーター活性を低下させる化合物を選択する（工程（c））ことによって実施することができる。

c-fos遺伝子のプロモーター領域は、c-fos cDNAや、c-fos遺伝子の配列を含む合成オリゴDNAをプローブとして用いてゲノムDNAライブラリーを通常の方法によりスクリーニングすることにより得ることができる。またはゲノムDNAを鋳型としたPCRによっても得ることができる。こうして得たDNA断片のうち適当な領域を、適当なレポーター遺伝子の上流調節領域に組み込むことでc-fosプロモーターレポーター遺伝子を作製することができる。レポーター遺伝子を含むプラスミドDNAとしては、pTAL-Luc（CLONTECH社）、pTA-Luc（CLONTECH社）、pTAL-SEAP（CLONTECH社）などを用いることができる。SREレポーター遺伝子は、例えば、「AGGATGTCCATATT

AGGACATCT／配列番号：7」からなる配列を複数回繰り返す配列を上記のような適当なレポーター遺伝子の upstream 領域に組み込むことで作製することができる。SREレポーター遺伝子 (pSRE-Luc) については市販されており (Stratagene社)、これを用いることもできる。

Ras/MEK/ERKシグナル伝達経路を構成するタンパク質を発現するベクターは次のようにして作製することができる。まず、Ras/MEK/ERKシグナル伝達経路を構成するタンパク質であるRasやMEK1の全オープンリーディングフレームを有するcDNAを通常のcDNAライブラリスクリーニングやRT-PCR法によりクローニングする。これを適当な動物細胞発現用ベクター、例えばpcDNA3ベクター (Invitrogen) などに組み込み発現ベクターとする。この際、恒常的に活性化状態のタンパク質を発現するように、適当な変異を加えることもできる。例えばRasの場合は、12番目のコドン Valなどに置換する。また、MEK1の場合は、上流のキナーゼによりリン酸化されることが判明している218番目と222番目のアミノ酸をGluなどに置換することにより、活性化タンパクとなることが知られている。変異の導入は、例えばGeneEditor™ (Promega社) などを用いた一般的な部位特異的変異導入法などによって行うことができる。

ベクターに発現させるRas/MEK/ERKシグナル伝達経路を構成する蛋白質としては、例えばRas、c-Raf、MEK1、MEK2を例示することができる。これら蛋白質を発現するベクターとしては、市販 (Stratagene社) のものを用いることもできる。

ベクターを導入する細胞としては、例えば、COS7細胞、HeLa細胞 (子宮頸部癌由来細胞)、HeLa細胞由来細胞 (HeLa S3など)、G361細胞 (メラノーマ)、ヒトTHP1、K562、SW480、HEK293、マウスNIH3T3、HL60 (ヒト白血病由来細胞)、正常線維芽細胞、正常上皮細胞、正常血管平滑筋細胞、正常骨芽細胞などの細胞を用いることができる。

スクリーニングに用い得るレポーター遺伝子としては、例えば、SREレポーター遺伝子 (pSRE-Luc、Stratagene社) などが挙げられる。ベクターの細胞への導入法

は、SuperFect (Qiagen社)、Lipofect Amine (GIBCO BRL社)などのリン脂質を用いた方法(具体的には実施例2に記載の方法)、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、DEAB-デキストラン法など、当業者に公知の方法により行なうことができる。

これにより調製された細胞に接触させる被検試料としては、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製蛋白質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物などを用いることができるが、特に制限はない。

被検試料を接触させた細胞のレポーター活性の測定は、ルシフェラーゼをレポーターとした場合は、ルシフェラーゼにより分解されると化学発光する適当な基質を用い、この発光をルミノメーターで測定することにより活性を評価することができる。ホタルルシフェラーゼをレポーターとした場合は、例えば、ホタルルシフェリンを基質として用いることができる。またウミシイタケルシフェラーゼをレポーターとした場合は、例えば、コエレンテラジンを基質として用いることができる。Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega社)などの市販のキットや試薬を用いることができる。 β ガラクトシダーゼやアルカリフォスファターゼなどをレポーターとした場合は、これらの酵素により分解されると発色する適当な基質、あるいは化学発光する適当な基質を用い、この発色、あるいは発光をそれぞれ分光光度計かルミノメーターで測定することにより活性を評価することができる。また、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)をレポーターとした場合は、例えば、 ^{14}C などで標識したクロラムフェニコールとアセチルCoAを基質として用い、生成したアセチルクロラムフェニコールの量を薄層クロマトグラフィーなどで分離して測定することにより活性を評価することができる。

この測定の結果、被検試料を接触させない場合と比較して、被検試料を接触させた場合において測定されるレポーター活性が低下していれば、用いた被検試料に含まれる化合物は、ポイツ・イエーガーズ症候群の治療薬の候補となる。

本発明は、また、MEK/ERKシグナル伝達を調節（促進あるいは抑制）する薬剤を提供する。本実施例において、LKB1蛋白質がMEK/ERKシグナル伝達を抑制することが示された。そして、この抑制が、LKB1蛋白質のキナーゼ活性に基づくことが示唆された。この事実は、LKB1蛋白質のキナーゼ活性あるいはLKB1蛋白質の発現を調節する化合物が、MEK/ERKシグナル伝達を調節する薬剤となりうることを意味する。本発明のMEK/ERKシグナル伝達を調節する薬剤は、かかる知見に基づくものである。

本発明の薬剤には、試験研究目的で用いる試薬および疾患の治療や予防などの目的で用いる医薬の双方が含まれる。本発明のMEK/ERKシグナル伝達を抑制する薬剤の有効成分としては、LKB1蛋白質のキナーゼ活性を促進する化合物やLKB1遺伝子の発現を促進する化合物を用いることができる。これら化合物は、上記のスクリーニングにより単離しうる。また、LKB1蛋白質または該蛋白質をコードするDNAを用いることも可能である。

一方、本発明のMEK/ERKシグナル伝達を促進する薬剤の有効成分としては、LKB1蛋白質のキナーゼ活性を促進する化合物やLKB1遺伝子の発現を抑制する化合物を用いることができる。これら化合物は上記のスクリーニングにより単離しうる。また、該薬剤の有効成分としてLKB1蛋白質に結合する抗体を用いることも可能である。該抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であっても良い。ヒトに投与する場合には、ヒト抗体や遺伝子組み換えによるヒト型化抗体であることが好ましい。これら抗体は、当業者に公知の方法により調製することができる。

また、本発明は、ポイツ・イエーガーズ症候群治療薬を提供する。本実施例においてポイツ・イエーガーズ症候群の原因遺伝子であるLKB1がMEK/ERKシグナル伝達を抑制することが示された。この事実は、MEK/ERKシグナル伝達の抑制する化合物がポイツ・イエーガーズ症候群の治療薬となり得ることを意味する。本発明のポイツ・イエーガーズ症候群の治療薬のスクリーニング方法は、かかる知見に基づくものである。

本発明のポイツ・イエーガーズ症候群治療薬の有効成分としては、MEK/ERKシグ

ナル伝達を抑制する化合物を用いることができる。該化合物は、c-fosプロモーターまたはSREの活性を抑制する化合物であり得る。SREはLKB1が関係するMEK/ERKシグナル伝達に特異的な要素であるため、SREの活性を抑制する化合物は、本発明のポイツ・イエーガーズ症候群の治療薬の有効成分として好適である。これら化合物は、上記の本発明のスクリーニングにより単離しうる。

本発明の薬剤をヒトや動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合には、有効成分である化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む

等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM)、HCO-50と併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

本発明の薬剤の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgであると考えられる。

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、通常、1日当り約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合であると考えられる。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量、あるいは体表面積あたりに換算した量を投与することができる。

図面の簡単な説明

図1は、活性化型K-Ras (K-RasV12) によるc-fosプロモーターの活性化に及ぼすLKB1の効果を検出した結果を示す図である。K-Rasを導入しない時のホタルルシフェラーゼの活性とウミシイタケルシフェラーゼの活性の比を1として、相対的な活性を表した(平均±標準偏差(n=3)(以下、表記法は同じ))。LKB1-WTは野生型LKB1を、LKB1-K78IはK78I変異体をそれぞれあらわす。+はそれぞれのタンパクを発現させたことを、-は発現させていないことを表す。三角は右側に行くに従ってトランスフェクションしたプラスミドDNA量が加していることを表す。

図2は、c-fosプロモーターレポーター遺伝子上の各種転写調節因子結合エレメントの活性化に関与する様々な細胞内シグナル伝達の模式図である。

図3は、MEK1によるSREの活性化に及ぼすLKB1の効果を検出した結果を示す図である。

図4は、MEKK1によるc-fosプロモーターの活性化に及ぼすLKB1の効果を検出した結果を示す図である。

図5は、MEKK1によるNF κ Bの活性化に及ぼすLKB1の効果を検出した結果を示す図である。

図6は、PKAによるc-fosプロモーターの活性化に及ぼすLKB1の効果を検出した結果を示す図である。

図7は、MEK1によるSREプロモーターの活性化に及ぼす各種LKB1変異体の効果を検出した結果を示す図および写真である。下は、それぞれの変異体のキナーゼ活性を表す。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1] プラスミドDNAの作製

(1) 発現プラスミドDNA

LK B1プライマー (5' gat gaa ttc ggg tcc agc atg gag gig gtg gac 3' / 配列番号: 1) とLK E2プライマー (5' gat gaa ttc tta gag gtc ttc ttc tga gat g ag ctt cig ctc cig cig ctt gca ggc cga 3' / 配列番号: 2) を用いたPCRを行うことにより、C末端にc-Myc エピトープ配列 (Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu) が付加された全ヒトLKB1アミノ酸配列をコードするDNA断片を増幅した。これをプライマーに付加したEcoRIサイトで切断した後、哺乳動物細胞用発現ベクターであるpcDNA3ベクター (Invitrogen) のEcoRIサイトに組み込んだ。シークエンシングによりPCRエラーが無いことを確認したクローン (pcDNA3/LKB1 myc) を選抜し発現実験に用いた。

また、pcDNA3/LKB1mycを鋳型とし、GeneEditor™ (Promega) を用いたin vitroミュータジェネシスにより、各種変異体の作製を行った。変異導入用プライマーは以下のものを使用した。

K78I変異体: 5' agg agg gcc gtc atc atc ctc aag aag 3' / 配列番号: 3

D176N変異体: 5' att gtg cac aag aac atc aag ccg ggg 3' / 配列番号: 4

W308C変異体: 5' cgg cag cac agc tgc ttc cgg aag aaa 3' / 配列番号: 5

L67P変異体: 5' gtg aag gag gtg ccg gac tgg gag acg 3' / 配列番号: 6

変異導入用プライマーとキットに添付されている選択用プライマー (ボトムストランド用) を共に一本鎖にした鋳型プラスミドDNAとアニールさせ、新たなDNA鎖を合成した。これを大腸菌に導入し、変異を持つプラスミドを保持したクローンをGeneEditor™抗生物質耐性クローンとして選択した。シークエンシングにより変異が入っていることを確認し、発現実験に用いた。

MEK1、MEKK1、PKA発現用のプラスミドDNA (それぞれpFC-MEK1、pFC-MEKK1、pFC-PKA) はStratagene社から購入した。

活性化型K-Ras発現プラスミドDNA (pCEV/k-RasV12) は神戸大学医学部のFukumoto Yauso博士より御供与いただいた。

ウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド (pRL/SV40) はPromega社から購入した。

(2) レポーター遺伝子

c-fosプロモーターレポーター遺伝子 (c-fosLV) は神戸大学医学部のFukumoto Yauso博士より御供与いただいた。SREレポーター遺伝子 (pSRE-Luc) はStratagene社から購入した。NF κ Bレポーター遺伝子 (pNF κ B-Luc) はClontech社から購入した。

[実施例2] レポーター遺伝子アッセイ

(1) トランスフェクション

トランスフェクションはSuperFect (Qiagen社) を用い、メーカーにより推奨されている方法に従って行った。すなわち、Hela細胞を 10^5 /ウェルで12ウェルプレートに蒔き、一晚培養後、DNA 1.5 μ gとSuperFect 4 μ lとの混合物を添加し、3時間培養した。その後培地を交換し、さらに24時間培養した後ルシフェラーゼ活性を測定した。

(2) ルシフェラーゼ活性の測定

ルシフェラーゼ活性は、Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega社) を用い、メーカー推奨の方法に従って、ウミシイタケルシフェラーゼを内在性コントロールとした二重測定法 (dual assay) にて測定した。すなわち、トランスフェクションした細胞を、PBSで洗浄した後、100 μ lの1 \times Passive Lysis Bufferにて溶解した。このうちの5 μ lを用い、Luciferase Assay Reagent II (50 μ l) をホタルルシフェラーゼの基質として、またStop & Glo^(®) Reagent (50 μ l) をウミシイタケルシフェラーゼの基質としてそれぞれのルシフェラーゼの活性を測定した。

(3) 結果

c-fosプロモーターレポーター遺伝子 (c-fosLV) が導入された細胞を用いて、RASによるc-fosプロモーターの活性化に対するLKB1の影響を検討した。その結果、L

KB1は、Rasによるc-fosプロモーターの活性化を顕著に抑制した（図1）。一方、自己リン酸化能を失ったLKB1変異体であるK78Iで同様に検討した場合では、Rasによるc-fosプロモーターの活性化を顕著に抑制することはなかった（図1）。

このc-fosプロモーターは、既知の転写調節因子結合エレメントとして、SRE（血清反応性エレメント）、CRE（cAMP反応性エレメント）、及びTRE（TPA反応性エレメント）を持つが（図2）、Rasによるこのプロモーターの活性化は、MEK/ERKを介する経路により、主にSREが活性化されることにより起こることが知られており（Fukumoto Y et al., J Biol Chem 1990 Jan 15;265(2):774-80）、LKB1は、MEK/ERKシグナル伝達経路のいずれかのステップに作用してSREの活性化を抑制したものと考えられた。そこで次に、LKB1が関与するステップについて検討した。

SREレポーター遺伝子（pSRE-Luc）が導入された細胞を用いて、MEK1によるSREの活性化に対するLKB1の影響を検討した。その結果、LKB1は、MEK1によるSREの活性化を顕著に抑制した（図3）。一方、K78Iで同様に検討した場合では、MEK1によるSREの活性化を顕著に抑制することはなかった（図3）。この事実から、LKB1は、MEK/ERKシグナル伝達経路の少なくともMEK1よりも下流で作用しているものと考えられた。

次に、LKB1がMEK/ERKシグナル伝達経路以外の経路に作用するか否かの検討を行った。c-fosプロモーターレポーター遺伝子（c-fosLV）が導入された細胞、またはNF κ Bレポーター遺伝子（pNF κ B-Luc）細胞を用いて、MEKK1またはPKAによるc-fosプロモーターまたはNF κ Bの活性化に対するLKB1の影響を検討した。その結果、LKB1は、MEKK1によるc-fosプロモーターの活性化（図4）、MEKK1によるNF κ B（Nuclear Factor of κ B cells）結合エレメントの活性化（図5）、PKA（cAMP依存性キナーゼ）によるc-fosプロモーターの活性化（図6）に対しては全く作用しないことが判明した。このことから、LKB1の作用は、少なくとも調べた範囲においてMEK/ERKシグナル伝達経路特異的であると考えられた。

次に、PJS患者において見出された変異体（L67P；67番目のLeuがProに置換した

変異体、D176N ; 176番目のAspがAsnに置換した変異体、W308C ; 308番目のTrpがCysに置換した変異体) の作用について調べた。SREレポーター遺伝子が導入された細胞を用いて、MEK1によるSREプロモーターの活性化に対するこれらLKB1変異体の影響を検討した。その結果、これらのキナーゼ活性が減弱した変異体は、そのMEK/ERK抑制効果も著しく減弱していることが明らかとなった(図7)。

産業上の利用の可能性

本発明によりLKB1を標的としたMEK/ERKシグナル伝達を調節する化合物のスクリーニング方法が提供された。さらに、MEK/ERKシグナル伝達を標的としたPJS治療薬候補化合物のスクリーニング方法が提供された。これによりMEK/ERKシグナル伝達を調節する化合物やPJS治療薬候補化合物を効率的にスクリーニングすることが可能となった。また、本発明により、これら化合物の薬剤用途が提供された。該薬剤は、MEK/ERKシグナル伝達を調節するための試薬として、あるいはPJSを含む疾患の治療や予防のための医薬としての利用が期待される。

請求の範囲

1. MEK/ERKシグナル伝達を抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) LKB1蛋白質に被検試料を接触させる工程、
 - (b) LKB1蛋白質のキナーゼ活性を測定する工程、および
 - (c) 被検試料を接触させない場合と比較して、工程(b)において測定されるキナーゼ活性を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法。
2. MEK/ERKシグナル伝達を抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) LKB1遺伝子を発現する細胞に被検試料を接触させる工程、
 - (b) 該細胞におけるLKB1遺伝子の発現量を測定する工程、および
 - (c) 被検試料を接触させない場合と比較して、工程(b)において測定されるLKB1遺伝子の発現量を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法。
3. MEK/ERKシグナル伝達を促進する化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) LKB1蛋白質に被検試料を接触させる工程、
 - (b) LKB1蛋白質のキナーゼ活性を測定する工程、および
 - (c) 被検試料を接触させない場合と比較して、工程(b)において測定されるキナーゼ活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。
4. MEK/ERKシグナル伝達を促進する化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) LKB1遺伝子を発現する細胞に被検試料を接触させる工程、
 - (b) 該細胞におけるLKB1遺伝子の発現量を測定する工程、および
 - (c) 被検試料を接触させない場合と比較して、工程(b)において測定されるLKB1遺伝子の発現量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。
5. ポイツ・イエーガーズ症候群の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) c-fosプロモーターまたはSREの下流にレポーター遺伝子が機能的に結合された構造を含むベクター、およびRas/MEK/ERKシグナル伝達経路を構成する蛋白質を

発現するベクターが導入された細胞を提供する工程、

(b) 該細胞に被検試料を接触させ、レポーター活性を測定する工程、および

(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、工程(b)において測定されるレポーター活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

6. Ras/MEK/ERKシグナル伝達経路を構成する蛋白質が、Ras、c-Raf、MEK1、およびMEK2からなる群より選択される、請求項5に記載の方法。

7. 請求項1または2に記載の方法により単離しうる、MEK/ERKシグナル伝達を抑制する化合物。

8. 請求項3または4に記載の方法により単離しうる、MEK/ERKシグナル伝達を促進する化合物。

9. 請求項5または6に記載の方法により単離しうる、ボイツ・イエーガーズ症候群の治療薬候補化合物。

10. LKB1のキナーゼ活性を促進する化合物を有効成分とする、MEK/ERKシグナル伝達を抑制する薬剤。

11. 化合物が請求項1に記載の方法により単離しうる化合物である、請求項10に記載の薬剤。

12. LKB1遺伝子の発現を促進する化合物を有効成分とする、MEK/ERKシグナル伝達を抑制する薬剤。

13. 化合物が請求項2に記載の方法により単離しうる化合物である、請求項12に記載の薬剤。

14. LKB1を有効成分とする、MEK/ERKシグナル伝達を抑制する薬剤。

15. LKB1のキナーゼ活性を抑制する化合物を有効成分とする、MEK/ERKシグナル伝達を促進する薬剤。

16. 化合物がLKB1蛋白質に結合する抗体である、請求項15に記載の薬剤。

17. 化合物が請求項3に記載の方法により単離しうる化合物である、請求項15に記載の薬剤。

18. LKB1遺伝子の発現を抑制する化合物を有効成分とする、MEK/ERKシグナル伝達を促進する薬剤。

19. 化合物が請求項4に記載の方法により単離しうる化合物である、請求項18に記載の薬剤。

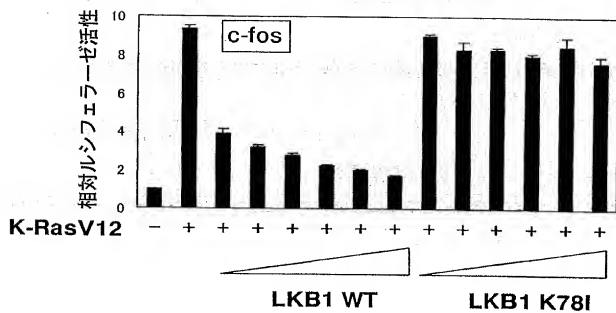
20. MEK/ERKシグナル伝達を抑制する化合物を有効成分とする、ポイツ・イエーガーズ症候群治療薬。

21. c-fosプロモーターまたはSREの活性を抑制する化合物を有効成分とする、ポイツ・イエーガーズ症候群治療薬。

22. 化合物が請求項5または6に記載の方法により単離しうる化合物である、請求項20または21に記載の治療薬。

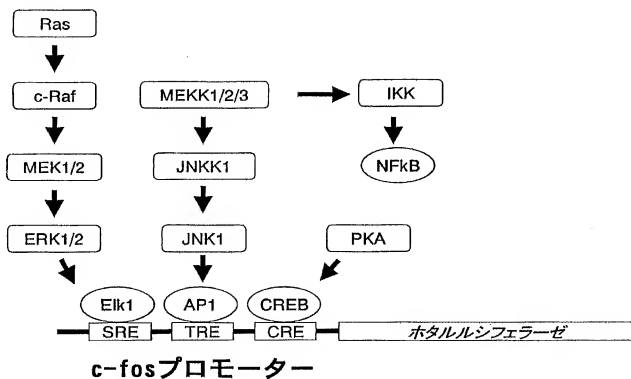
1 / 7

図 1



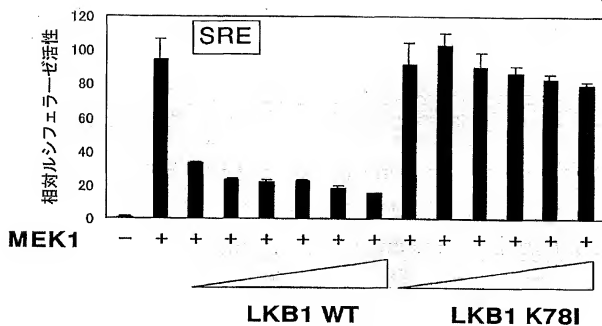
2 / 7

図 2



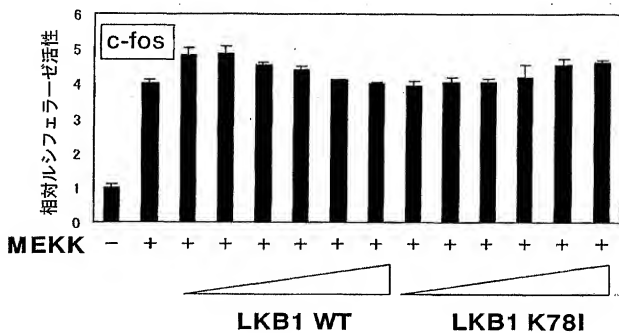
3 / 7

図 3



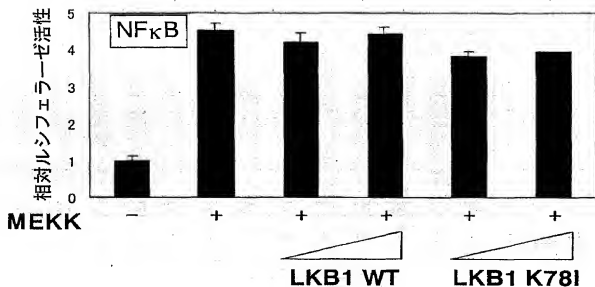
4 / 7

図 4



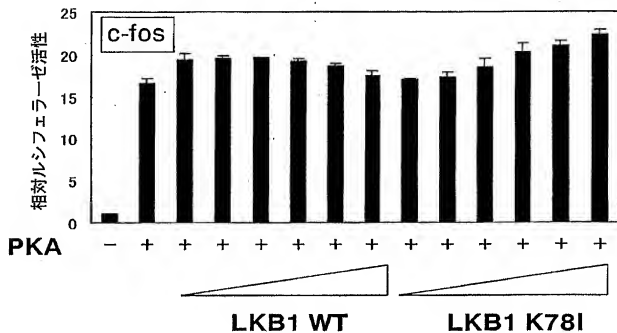
5 / 7

図 5



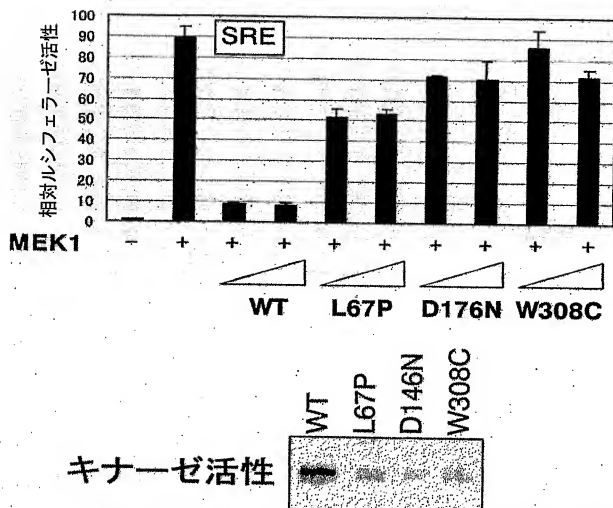
6/7

図 6



7 / 7

図 7



1 / 5

SEQUENCE LISTING

<110> Chugai Research Institute for Molecular Medicine, Inc.

<120> Method for screening a compound regulating MEK/ERK signal
transduction, and usage of said compound as a drug.

<130> C2-A0004P

<140>

<141>

<150> JP 2000-223892

<151> 2000-07-19

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

2 / 5

Synthesized Primer Sequence

<400> 1

gatgaattcg ggiccagcat ggaggtggcg gac

33

<210> 2

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 60

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 2

gatgaattct tagaggtctt ctctgagat gagcttctgc tctgctgct tgcaggccga 60

<210> 3

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 27

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

3 / 5

Synthesized Primer Sequence

<400> 3

aggagggccg icaatcctt caagaag

27

<210> 4

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 27

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

atttgcaca agaacaacaa gccgggg

27

<210> 5

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 27

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

4 / 5

Synthesized Primer Sequence

<400> 5

cggcagcaca gctgcttcgc gaagaaa

27

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 6

gigaaggagg tgccggactc ggagacg

27

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

5/5

Synthesized Primer Sequence

<400> 7

aggatgtcca tattaggaca tct

23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06171

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁷ C12Q1/48, G01N33/50, G01N33/15, C12N15/00, A61K45/00, A61K39/395, A61P1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁷ C12Q1/48, G01N33/50, G01N33/15, C12N15/00, A61K45/00, A61K39/395, A61P1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAMID Mehenni et al., "Loss of LKB1 Kinase Activity in Peutz-Jeghers Syndrome, and Evidence for Allelic and Locus Heterogeneity", Am. J. Hum. Genet., (1998), Vol. 63, No. 6, pages 1641 to 1650	1-6, 14, 16
A	YASUO Fukumoto et al., "Activation of the c-fos Serum-response Element by the Activated c-Ha-ras Protein in a Manner Independent of Protein Kinase C and cAMP-dependent Protein Kinase", The Journal of Biological Chemistry, January, 1990, Vol. 265, No. 2, pages 774 to 780	1-6, 14, 16
P, A	WO 01/10905 A1 (Chugai Res. Inst. Molecular Medicine Inc.), 15 February, 2001 (15.02.01) (Family: none)	1-6, 14, 16
P, A	WO 00/72670 A1 (Chugai Res. Inst. Molecular Medicine Inc.), 07 December, 2000 (07.12.00) (Family: none)	1-6, 14, 16
A	WO 99/28459 A1 (Chugai Res. Inst. Molecular Medicine Inc.), 10 June, 1999 (10.06.99), & EP 1036844 A1	1-6, 14, 16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search 24 August, 2001 (24.08.01)	Date of mailing of the international search report 04 September, 2001 (04.09.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06171

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO 01/34201 A2 (Advanced Res. & Technology Inst.), 17 May, 2001 (17.05.01) (Family: none)	1-6, 14, 16
A	US 6074861 A (Nat. Jewish Cent. Immunology & Respiratory), 13 June, 2000 (13.06.00) (Family: none)	1-6, 14, 16
A	US 6010856 A (Scripps Res. Inst.), 04 January, 2000 (04.01.00) (Family: none)	1-6, 14, 16

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06171

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 7-13,15,17-22
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
In the above claims, the compounds, drugs or remedies are specified by the screening method or defined by the desired property. Even though the statement in the description is taken into consideration, it is unknown what particular substances are involved therein. Thus, the above claims are described in an extremely unclear manner.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12Q1/48, G01N33/50, G01N33/15, C12N15/00, A61K45/00, A61K39/395, A61P1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12Q1/48, G01N33/50, G01N33/15, C12N15/00, A61K45/00, A61K39/395, A61P1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	HAMID Mehenni et al. Loss of LKB1 Kinase Activity in Peutz-Jeghers Syndrome, and Evidence for Allelic and Locus Heterogeneity. Am. J. Hum. Genet. 1998, Vol. 63, No. 6, p. 1641-1650	1-6, 14, 16
A	YASUO Fukumoto et al. Activation of the <i>c-fos</i> Serum-response Element by the Activated <i>c-Ha-ras</i> Protein in a Manner Independent of Protein Kinase C and cAMP-dependent Protein Kinase. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY January, 1990, Vol. 265, No. 2, p. 774-780	1-6, 14, 16

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に基拠を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に及ぼす文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性が認められるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 08. 01

国際調査報告の発送日

04.09.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JJP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

9162

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	WO 01/10905 A1 (CHUGAI RES INST MORECULAR MEDICINE INC) 15.02月.2001 (15.02.01) ファミリーなし	1-6, 14, 16
P, A	WO 00/72670 A1 (CHUGAI RES INST MORECULAR MEDICINE INC) 07.12月.2000 (07.12.00) ファミリーなし	1-6, 14, 16
A	WO 99/28459 A1 (CHUGAI RES INST MORECULAR MEDICINE INC) 10.06月.1999 (10.06.99) & EP 1036844 A1	1-6, 14, 16
P, A	WO 01/34201 A2 (ADVANCED RES & TECHNOLOGY INST) 17.05月.2001 (17.05.01) ファミリーなし	1-6, 14, 16
A	US 6074861 A (NAT JEWISH CENT IMMUNOROgy & RESPIRATORY) 13.06月.2000 (13.06.00) ファミリーなし	1-6, 14, 16
A	US 6010856 A (SCRIPPS RES INST) 04.01月.2000 (04.01.00) ファミリーなし	1-6, 14, 16

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条 (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 7-13, 15, 17-22 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
上記請求の範囲では、化合物、薬剤又は治療薬が、スクリーニング方法により特定されているか、所望の性質により定義されているが、明細書の記載を参酌してもそれらが具体的にどのような物質を包含するものか記載されていないから、上記請求の範囲の記載は著しく不明確である。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉 (1)) (1998年7月)

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes the need for transparency and accountability in financial reporting.

2. The second part of the document outlines the various methods and techniques used to collect and analyze data. It includes a detailed description of the experimental procedures and the statistical analysis performed.

3. The third part of the document presents the results of the study. It includes a series of tables and graphs that illustrate the findings of the research. The data shows a clear trend of increasing activity over time.

4. The final part of the document discusses the implications of the findings and provides recommendations for future research. It suggests that further studies should be conducted to explore the underlying causes of the observed trends.